



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> :</b> <b>C12N 1/14, 9/34, 9/62, 9/24, C12P 7/06,</b> <b>A23K 1/165 // (C12N 1/14, C12R 1:685)</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 00/43496</b> <b>(43) Date de publication internationale: 27 juillet 2000 (27.07.00)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR00/00163 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 25 janvier 2000 (25.01.00) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 99/00775 25 janvier 1999 (25.01.99) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> GIE AGRO INDUSTRIE [FR/FR]; 23, rue du Château, F-10100 Romilly sur Seine (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> LABEILLE, Pierre, Jean [FR/FR]; Appartement 214, 91, boulevard Henri Vasnier, F-51100 Reims (FR). BARET, Jean-Luc, Alain, Guy [FR/FR]; 36, rue de Seine, F-77250 Veneux Les Sablons (FR). DUCHIRON, Francis, Lucien [FR/FR]; 4, allée Jean Goujon, F-51100 Reims (FR). <b>(74) Mandataire:</b> COLAS, Jean-Pierre; Cabinet De Boisse et Colas, 37, avenue Franklin D. Roosevelt, F-75008 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title:</b> MULTI-ENZYME PRODUCT WITH GLUCOAMYLASE, PROTEOLYTIC AND XYLANASE ACTIVITIES AND METHOD FOR PRODUCING SAME BY SOLID STATE FERMENTATION OR WHEAT BRAN WITH <i>ASPERGILLUS</i> <i>NIGER</i> <b>(54) Titre:</b> PRODUIT MULTITENZYMATIQUE A ACTIVITES GLUCOAMYLASIQUE, PROTEOLYTIQUE ET XYLANASIQUE ET PROCEDE POUR SA PRODUCTION PAR FERMENTATION A L'ETAT SOLIDE DE SON DE BLE AVEC <i>ASPERGILLUS</i> <i>NIGER</i> <b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns a multi-enzyme product with glucoamylase, proteolytic and xylanase activities, characterised in that it consists of wheat bran fermented with an <i>Aspergillus niger</i> strain, said enzymatic glucoamylase, proteolytic and xylanase activities being present in the following minimum values: glucoamylase activity: at least 100 UG per gram of dry matter; proteolytic activity: at least 100 UP per gram of dry matter; xylanase activity: at least 100 UX per gram of dry matter, provided that the glucoamylase activity is at least 750 UG per gram of dry matter and/or the xylanase activity is at least 300 UX per gram of dry matter. The invention is useful for producing ethanol or monogastric animal feed.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>Produit multienzymatique présentant des activités glucoamylasique, protéolytique et xylanasique, caractérisé en ce qu'il est constitué de son de blé fermenté avec une souche d'<i>Aspergillus niger</i>, lesdites activités enzymatiques glucoamylasique, protéolytique et xylanasique étant présentes aux valeurs minimales suivantes: glucoamylasique: au moins 100 UG par gramme de matière sèche; protéolytique: au moins 100 UP par gramme de matière sèche; xylanasique: au moins 100 UX par gramme de matière sèche; avec la condition que l'activité glucoamylasique soit d'au moins 750 UG par gramme de matière sèche et/ou l'activité xylanasique soit d'au moins 300 UX par gramme de matière sèche. Utilisation dans la production d'éthanol ou d'aliments pour animaux monogastriques.</p>		

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PRODUIT MULTIENZYMATIQUE A ACTIVITES GLUCOAMYLASIQUE,  
PROTEOLYTIQUE ET XYLANASIQUE ET PROCEDE POUR SA  
PRODUCTION PAR FERMENTATION A L'ETAT SOLIDE DE SON DE  
BLE AVEC *ASPERGILLUS NIGER*

5 L'invention concerne un produit multienzymatique à activités glucoamylasique, protéolytique et xylanasique et procédé pour sa production par fermentation à l'état solide de son de blé avec *Aspergillus niger*.

10 Il est connu de produire de l'éthanol à partir d'amidon de maïs par un procédé enzymatique comprenant une étape de liquéfaction de l'amidon par une alpha-amylase visant à hydrolyser l'amidon en dextrines, puis une étape de saccharification par une glucoamylase (appelée aussi amylo-glucosidase) visant à hydrolyser les dextrines en glucose, et enfin une étape de fermentation de ce dernier en éthanol.

15 La mise en œuvre des enzymes alpha-amylase et glucoamylase est généralement satisfaisante lorsqu'on part de laits d'amidon relativement purs obtenus par broyage par voie humide du maïs, mais lorsqu'on désire substituer des amidons de blé ou des farines de blé à l'amidon de maïs, on n'obtient pas de résultats satisfaisants avec ces deux seules enzymes en  
20 raison de la présence d'hémicelluloses qui accroissent la viscosité des moûts de farine saccharifiés au point que cela crée un problème pour l'exécution du procédé. Il faut utiliser dans l'étape de saccharification des enzymes auxiliaires comme des cellulases et des hémicellulases pour réduire la viscosité et remédier à ce problème. Par ailleurs, il est souhaitable  
25 d'utiliser également des protéases au cours de la saccharification afin d'hydrolyser les protéines de la farine et enrichir ainsi le moût en azote soluble en prévision de l'étape ultérieure de fermentation alcoolique. L'apport en source azotée nécessaire à la croissance des levures traditionnellement effectué pendant cette fermentation peut ainsi être  
30 réduit.

Toutes ces enzymes sont individuellement disponibles dans le commerce sous forme purifiée, mais ont l'inconvénient d'être relativement

onéreuses et, donc, de grever, par conséquent, le coût de la production de l'éthanol de blé. En outre, il faut formuler des compositions à partir des enzymes individuelles, ce qui complique le procédé.

Il existe donc un besoin pour un produit multienzymatique, bon marché, combinant des activités glucoamylasique, protéolytique et hémicellulasique afin de pouvoir produire de l'éthanol à partir de farines de blé à un coût réduit.

L'invention vise à satisfaire ce besoin.

La présente invention concerne un produit multienzymatique présentant des activités glucoamylasique, protéolytique et xylanasique, caractérisé en ce qu'il est constitué de son de blé fermenté avec une souche d'*Aspergillus niger*, lesdites activités enzymatiques glucoamylasique, protéolytique et xylanasique étant présentes aux valeurs minimales suivantes :

- glucoamylasique : au moins 100 UG par gramme de matière sèche,
  - protéolytique : au moins 100 UP par gramme de matière sèche,
  - xylanasique : au moins 100 UX par gramme de matière sèche,
- avec la condition que l'activité glucoamylasique soit d'au moins 750 UG par gramme de matière sèche et/ou l'activité xylanasique soit d'au moins 300 UX par gramme de matière sèche.

De préférence, l'activité glucoamylasique est d'au moins 1 500 UG par gramme de matière sèche et/ou l'activité xylanasique est d'au moins 400 UX par gramme de matière sèche.

De préférence également, l'activité protéolytique est d'au moins 400 UP par gramme de matière sèche.

L'invention concerne aussi un procédé de production de ce produit multienzymatique caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à (a) prendre du son de blé ; (b) à humidifier et traiter thermiquement ledit son de façon à le pasteuriser ou le stériliser ; (c) à inoculer le son de blé résultant par une souche d'*Aspergillus niger* ; (d) le son étant sous la forme d'une couche d'au moins 10 cm d'épaisseur, le faire fermenter à l'état solide dans un réacteur aéré et agité périodiquement pendant une période de 1 à

3 jours, à une température de 28-38°C, de préférence 32 à 36°C, ledit son étant réglé à une teneur en humidité initiale de 50 à 60% en poids sensiblement maintenue pendant la durée de la fermentation, dans des conditions d'aération propres à éviter une accumulation de dioxyde de carbone nuisible à la fermentation dans le réacteur et une élévation de la température due à la fermentation au-delà de la gamme indiquée, jusqu'à ce que le produit de fermentation présente les valeurs minimales suivantes d'activités enzymatiques :

- glucoamylasique : au moins 100 UG par gramme de matière sèche
  - 10 - protéolytique : au moins 100 UP par gramme de matière sèche
  - xylanasique : au moins 100 UX par gramme de matière sèche,
- avec la condition que l'activité glucoamylasique soit d'au moins 750 UG par gramme de matière sèche et/ou l'activité xylanasique soit d'au moins 300 UX par gramme de matière sèche.

15 De préférence, l'activité glucoamylasique est d'au moins 1 500 UG par gramme de matière sèche et/ou l'activité xylanasique est d'au moins 400 UX par gramme de matière sèche.

De préférence également, l'activité protéolytique est d'au moins 400 UP par gramme de matière sèche.

20 De préférence, la souche d'*Aspergillus niger* est choisie parmi la souche NRRL 3112, la souche ATCC 76061 et les souches obtenues à partir desdites souches par sélection ou mutation lorsqu'on recherche une activité glucoamylasique élevée. La souche ATCC 76061 est particulièrement préférée.

25 Lorsqu'on recherche une activité glucoamylasique élevée, le son de blé utilisé comme matière de départ doit être un son non désamidonné. A part cette restriction on peut utiliser un son quelconque. De préférence, toutefois, le son comporte une proportion significative (au moins 40% en poids) de particules inférieures à 1 mm.

30 On donne ci-après, à titre illustratif et non limitatif, les caractéristiques de deux sons convenables.

<u>Caractéristiques</u>	<u>Son A</u>	<u>Son B</u>
Humidité (%)	12,3	19,5
Teneur en protéines (% MH*)	13,8	14,8
Teneur en amidon (% MH*)	24,6	21,3

#### Granulométrie

>1,25 mm	53,9	0,7
entre 1,0 et 1,25 mm	8,1	1,3
entre 0,5 et 1,0 mm	33,3	68,2
entre 0,25 et 0,5 mm	3,7	24,6
entre 0,16 et 0,25 mm	0,3	2,6
< 0,16 mm	0,7	2,6

%MH = % par rapport à la matière humide.

Le son de blé doit être humidifié et traité thermiquement en vue de le pasteuriser ou le stériliser. Il est avantageux que le traitement thermique ne précède pas l'humidification, car on a observé des résultats de fermentation médiocres dans le cas où on traite thermiquement le son avant de l'humidifier. Le traitement thermique peut consister en un chauffage par exemple dans un autoclave. Un traitement en autoclave de 20 mn à 120-121°C s'est avéré très satisfaisant, mais des conditions moins sévères (pasteurisation à 105°C, pendant 15 mn dans une étuve) conviennent aussi. Il est possible également d'opérer le traitement thermique du son en y injectant de la vapeur d'eau, ce qui peut permettre d'opérer simultanément l'humidification du son.

Avantageusement, on peut régler le pH lors de l'humidification dans la gamme de 4 à 5,5 afin d'améliorer l'effet pasteurisant du traitement thermique et le démarrage de la fermentation souhaitée.

Outre sa fonction de stérilisation, le traitement thermique a pour effet de favoriser la gélatinisation de l'amidon contenu dans le son de blé et, donc la disponibilité de ce substrat pour le champignon *Aspergillus niger*, ce qui permet des fermentations plus efficaces.

L'humidification du son est importante car la teneur en eau influe sur la performance de la fermentation. La teneur en eau initiale du son est réglée initialement à 50-60%, de préférence 50-55%, de la masse totale du son et de l'eau et on la maintient sensiblement dans cet intervalle pendant la fermentation, par exemple en procédant périodiquement à des apports d'eau pour compenser la perte en eau du milieu. L'expression "sensiblement maintenue" veut dire qu'il est tolérable que le taux d'humidité prenne une valeur s'écartant un peu ( $\pm 5$  unités %) de l'intervalle de 50-60% pendant une relativement brève période entre deux ajustements successifs du taux d'humidité ou en fin de fermentation. Il est avantageux, en tout cas, de ne pas descendre en dessous d'un taux d'humidité de 45%. Le taux d'humidité du milieu de culture tend à baisser au cours de la culture par évaporation sous l'effet de l'augmentation de température générée par la croissance fongique, ledit milieu étant un mauvais conducteur de la chaleur. La qualité de l'eau utilisée joue aussi un rôle non négligeable. On peut utiliser une eau courante de bonne qualité ou de l'eau distillée.

L'inoculation du son de blé peut se pratiquer avec tout inoculum approprié. L'homme du métier connaît de multiples façons de préparer un inoculum convenable à partir d'une souche sélectionnée. La dose d'inoculation est avantageusement d'au moins  $1 \times 10^7$  spores/gramme de matière sèche initiale.

La fermentation peut être conduite dans tout réacteur approprié. Des exemples de réacteur utilisable sont ceux décrits dans l'article de A. DURAND et Coll. publié dans Agro-Food-Industry Hi-Tech (Mai-Juin 1997, pages 39-42).

La fermentation peut être conduite pendant une période de 1 à 3 jours, de préférence de 30 à 60 heures. En dessous de 1 jour, la fermentation est par trop incomplète. Au bout de 3 jours la fermentation est achevée ou quasiment achevée de sorte qu'il serait non économique de la prolonger davantage. La température du milieu est typiquement maintenue entre 28 et 38°C, de préférence entre 32 et 36°C, ce qui

correspond au domaine d'activité optimum connu des souches d'*Aspergillus niger* à utiliser dans l'invention. Avantageusement, à cette fin, la température de l'air est réglée à 34-38°C pendant les premières heures de la fermentation pour favoriser la germination des spores, puis réduite à 28-32°C pour le reste de la fermentation pour contribuer à la régulation de la température du milieu.

Le pH du milieu de fermentation n'est pas régulé habituellement. Si sa valeur de départ est voisine de 6,0-6,4, le pH baisse à 3,8-4,2, au cours de la culture, puis remonte à la fin. Ce retour est généralement corrélé avec la phase de sporulation du champignon. Le suivi de l'évolution du pH constitue un bon indicateur de l'état de la culture.

Le fermenteur doit être aéré, de préférence en continu, afin d'apporter l'oxygène nécessaire à la fermentation et éviter l'accumulation excessive de dioxyde de carbone produit par la fermentation. En outre, l'aération participe au contrôle de la température et de l'humidité du milieu de culture. L'air sera, de préférence, sensiblement saturé en eau pour limiter la tendance à l'assèchement du milieu. Il est difficile de donner des indications quantitatives sur le débit d'aération, car de multiples variables, en particulier la taille et la géométrie du réacteur, la quantité du son chargée, etc..., interviennent. De simples essais de routine permettront, toutefois, à l'homme de l'art de déterminer aisément un débit d'aération convenable dans chaque cas pratique.

La charge de son dans le fermenteur doit être périodiquement ajoutée à l'aide des moyens d'agitation, tels que des bras agitateurs, des lames ou spatules, ou des vis sans fin au cours de la fermentation en vue d'éviter la formation de masses imperméables et afin que l'aération intéresse de la façon la plus homogène possible toute la masse de son. Il faut, toutefois, éviter une agitation trop vigoureuse qui pourrait nuire au champignon.

Le produit de l'invention est un produit solide qui est utile notamment pour la production d'éthanol à partir du blé. Il peut être directement ajouté à l'amidon liquéfié (dextrines) obtenu dans l'étape de



liquéfaction, afin de procéder à la saccharification. Pour cette application, c'est l'activité glucoamylasique qui est le facteur le plus important. On utilisera donc, de préférence un produit de l'invention ayant une activité glucoamylasique, par exemple d'au moins 750 UG, de préférence d'au moins 1500 UG par gramme de matière sèche.

Une autre utilisation possible du produit de l'invention concerne la production d'aliments pour animaux monogastriques, par exemple la volaille et les porcs, à base de blé. Dans cette application, c'est l'activité xylanasique qui constitue le facteur le plus important. On utilisera donc, de préférence, dans cette application, un produit ayant une activité xylanasique élevée, par exemple d'au moins 400 UX par gramme de matière sèche.

Le produit de l'invention peut être séché ou congelé en vue de sa conservation, si désiré.

Le séchage doit être réalisé à une température modérée pour ne pas affecter l'activité enzymatique. Un chauffage en étuve à 40°C s'est révélé approprié, par exemple. La congélation, de son côté, peut être réalisée sur le produit humide à basse température, par exemple à -20°C.

Dans les exemples, les diverses activités enzymatiques ont été mesurées par les méthodes suivantes :

a) Activité glucoamylasique

L'action d'une préparation de glucoamylase (GA) sur une solution d'amidon entraîne la libération de sucres réducteurs. Chauffés à 100°C en présence d'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS), ces compositions prennent une couleur brune mesurée au spectrophotomètre (Kontron Instruments, Milan, Italie) à 540 nm.

Le milieu réactionnel contient

- Solution d'amidon 1 % : 500 µl
- Tampon citrate 0,1 à pH 4,5 450 µl
- Solution enzymatique : 50 µl

La réaction se déroule pendant 30 min. à 60°C (55°C pour les GA d'A.orizae). Des prélèvements sont réalisés toutes les 5 min., mélangés avec

du DNS et placés dans un bain glacé. Ils sont ensuite chauffés 5 min. à 100°C, refroidis rapidement puis dosés à 540 nm.

Nous avons établi ces conditions de dosage après avoir étudié l'influence de la température et du pH sur l'activité de nos préparations de GA. De l'amidon soluble Merck (Darmstadt, Allemagne) a été employé  
5 comme substrat de cette hydrolyse enzymatique. Le DNS est préparé selon le protocole proposé par P. Bernfeld, Methods in enzymology, 1, 149-158 (1955) qui est le suivant :

⇒ Dissoudre préalablement :

- 10       \* 10 g d'acide 3,5-dinitrosalicylique,
- \* 200 ml de soude 2 molaires
- \* 200 ml d'eau distillée.

⇒ Ajouter ensuite :

- \* 300 g de tartrate double de sodium potassium.

- 15       ⇒ Compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée après dissolution totale :

Une fois préparé, ce réactif doit être conservé à l'abri de la lumière. Les courbes d'étalonnage ont été établies avec du glucose comme produit de référence pour le dosage de l'activité glucoamylase ou pour le suivi des  
20 réactions de liquéfaction- saccharification, et avec du xylose pour mesurer l'activité xylanase.

Une unité d'activité glucoamylase (UG) correspond à la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une micromole d'extrémités réductrices par minute dans les conditions du dosage avec le glucose  
25 comme référence. L'activité glucoamylase, calculée à l'aide de la formule indiquée ci-dessous, est rapportée à la quantité de matière sèche initiale (MSI) :

$$A = (P/V_{enz}) * (V_{ferm}/M_{ferm})$$

- \* A correspond à l'activité GA exprimée en UG.gMSI<sup>-1</sup> (μmol.min<sup>-1</sup>.gMSI<sup>-1</sup>),
- 30   \* P correspond à la vitesse de libération d'équivalents glucose en μmol.min<sup>-1</sup>,
- \* Venz représente le volume de la solution d'enzymes dosée en ml,

\* V<sub>ferm</sub> est le volume total d'eau distillée utilisé pour extraire la solution d'enzymes en ml,

\* M<sub>ferm</sub>, exprimée en g de MSI, correspond à la masse initiale de produit sec dont a été extraite la solution d'enzymes.

5           b) Activité protéase

Ce dosage a été mis au point sur de l'azocaséine selon la méthode de Bénon, décrite dans l'ouvrage "Proteins Purification Methods - a Practical Approach", Harris E.L.V. et Angal, S (Editeurs), IRL-Press, Oxford University Press, 1-66 (1989). La dégradation de ce substrat par des  
10 protéases entraîne la libération de groupements azo qui absorbent dans l'UV à 340 nm. L'évolution de l'absorbance pendant la cinétique d'hydrolyse de cette protéine indique l'importance de la réaction.

Le milieu réactionnel contient :

- |    |   |         |
|----|---|---------|
|    | * Solution d'azocaséine à 1 %, pH 5,0 : | 1000 µl |
| 15 | * Solution enzymatique :                | 200 µl  |

L'azocaséine (Sigma, Saint-Louis, Etats-Unis) est dissoute dans un tampon acétate 0,1 M à pH 5,0. On a dosé les activités protéases à ce pH car l'azocaséine est insoluble dans le tampon acétate à des pH inférieurs. La réaction enzymatique est réalisée à 60°C. Des prélèvements sont  
20 réalisés toutes les 5 min. pendant 20 min. et mélangés avec de l'acide trichloroacétique (TCA) à 5 % pour stopper la réaction.

Une unité d'activité protéase (UP) correspond à la quantité d'enzymes nécessaire à l'augmentation de 0,01 unité A<sub>340nm</sub> par minute, générée par la libération de groupes azo dans les conditions citées  
25 précédemment. Cette activité, calculée d'après la formule indiquée ci-dessous, est rapportée à la matière sèche initiale (UP.G<sup>-1</sup> MSI) ou l'activité glucoamylase (UP.UG<sup>-1</sup>) :

$$A = (P/V_{enz}) * (V_{ferm}/M_{ferm})$$

\* A correspond à l'activité protéase exprimée en UP.gMSI<sup>-1</sup>,

30 \* P correspond à la vitesse de libération des groupements azo exprimée en augmentation de 0,01 unité A<sub>340nm</sub>.min<sup>-1</sup>,

- \* Venz représente le volume de la solution d'enzymes dosée en ml,
- \* Vferm est le volume total d'eau distillée utilisé pour extraire la solution d'enzymes en ml,

\*Mferm, exprimée en g de MSI, correspond à la masse initiale de produit

5        sec dont a été extraite la solution d'enzymes.

c) Activité xylanase

Pour mettre en évidence cette activité enzymatique, on a fait agir les préparations de GA sur une solution de xylane soluble et on a mesuré les sucres réducteurs libérés par la méthode au DNS.

10        Le milieu réactionnel est composé de :

- \* Solution de xylane à 1 %, pH 4,5 :                    900  $\mu$ l
- \* Solution enzymatique :                                    100  $\mu$ l

La solution de xylane de mélèze (Sigma à 1 % est préparée dans du tampon citrate à pH 4,5 et la réaction se déroule à 60°C. Des prélèvements  
15        sont effectués toutes les 5 min. pendant 20 min., mélangés avec du DNS et placé dans un bain glacé. Ils sont ensuite dosés selon un protocole identique à celui exposé pour la mesure des activités GA avec le xylose comme référence.

Une unité d'activité xylanase (UX) correspond à la quantité  
20        d'enzymes nécessaire à la libération d'une micromole de sucres réducteurs par minute. Cette activité est rapportée à la matière sèche initiale (UX.g<sup>-1</sup> MSI) ou à l'activité glucoamylase (UX.UG<sup>-1</sup>). Pour calculer cette activité, nous avons repris la formule définie pour le calcul des activités GA dans laquelle :

25        \* A correspond à l'activité xylanase exprimée en UX.gMSI<sup>-1</sup> ( $\mu$ mol.min.<sup>-1</sup>.gMSI<sup>-1</sup>),

\* P correspond à la vitesse de libération d'équivalents xylose en  $\mu$ mol.min<sup>-1</sup>,

\* Les autres termes de la formule ne sont pas modifiés.

30        Les exemples non limitatifs suivants sont donnés en vue d'illustrer l'invention

EXEMPLE 1 - Sélection de souches d'*Aspergillus*

On a étudié de façon comparative l'aptitude de sept souches différentes d'*Aspergillus* disponibles dans le commerce à produire de la glucoamylase par fermentation en milieu solide de son de blé.

5 Les essais ont été effectués sur 50 g de milieu de fermentation dans une fiole d'Erlenmeyer. Le milieu était constitué de 21,5 g de son de blé, de 27,5 g d'eau, et de 1 g d'amidon de blé. Le pH initial du milieu était de 6,0-6,5. Le milieu a été stérilisé pendant 20 min dans un autoclave à 120°C.

10 On a inoculé chaque milieu avec  $2.10^7$  spores de la souche à tester par gramme de matière sèche initiale. L'âge des spores était de 3 jours. On a laissé la fermentation se dérouler pendant 40 ou 50 heures, les fioles d'Erlenmeyer étant placées dans une étuve à 35°C. A la fin de la fermentation on a mélangé le milieu fermenté avec 150 ml d'eau distillée afin de mettre les enzymes produites en solution, puis on a filtré pour  
15 récupérer la solution enzymatique. On a centrifugé la solution pour éliminer les spores et particules résiduelles, puis on a conditionné la solution en flacons de 100 ml que l'on a conservée à -20°C jusqu'à l'analyse de l'activité glucoamylasique.

20 Les souches testées et les résultats obtenus sont récapitulés dans le Tableau 1 suivant :

Réf. souches de collections	Durée de la FMS (h)	Ac. GA (UG.g <sup>-1</sup> MSI)
<i>A. niger</i> ATCC 76060	50	627
<i>A. niger</i> ATCC 76061	50	943
<i>A. niger</i> MUCL 28815	40	710
<i>A. niger</i> MUCL 28816	40	631
<i>A. niger</i> NRRL 3112	50	1056
<i>A. oryzae</i> ATCC 22788	50	903
<i>A. oryzae</i> ATCC 42149	50	861

On voit que les souches *A. niger* NRRL 3112, *A. niger* ATCC 76061 et *A. oryzae* ATCC 226788 ont les meilleures activités en terme de production de glucoamylase.

Une autre propriété importante à prendre en considération, toutefois, est la stabilité de la glucoamylase produite. On a donc procédé à des essais de thermostabilité en effectuant des traitements thermiques des solutions enzymatiques à 55 et 60°C pendant 30 min et en mesurant l'activité de la glucoamylase au bout de ce temps. Ces traitements se rapprochent des conditions d'utilisation pour la saccharification de l'amidon. Il a été trouvé que les souches *A. niger* ATCC 76061 et *A. niger* NRRL 3112 donnaient les glucoamylases les plus stables (100% d'activité résiduelle après 30 min à 55°C et environ 50% d'activité résiduelle après 30 min à 60°C) alors que les souches *A. oryzae* ATCC 22788 et ATCC 42149 donnaient des glucoamylases ayant 0% d'activité résiduelle après 30 min à 60°C et 46% d'activité résiduelle après 30 min à 55°C. Ceci nous a donc conduit à sélectionner les souches ATCC 76061 et NRRL 3112 de *A. niger*. Par ailleurs la souche *A. niger* NRRL 3112 s'est avérée être génétiquement assez instable (perte d'activité après quelques cycles reproductifs) de sorte que la souche la plus préférée est la souche ATCC 76061 de *A. niger*. C'est cette souche qui a donc été utilisée dans les exemples suivants .

**EXEMPLE 2** - Production de glucoamylases en cuves pilotes fournies par l'INRA de 50 l non stériles : importance du prétraitement du son de blé.

Les essais ont été réalisés avec un fermenteur non-stérile de 50 l conforme à celui décrit dans l'article de A. DURAND et collaborateurs précité (Figure 1) et du son de blé BCE (fourni par la distillerie Brie Champagne Ethanol, Provins, France). Deux modes de préparation du son ont été mis en œuvre pour obtenir 5 kg milieu de culture à 55% d'humidité :

- son sec : le son est autoclavé 1 h à 105°C puis mélangé à de l'eau (essai F4C3) ;

- son humide : le son est humidifié à 45% dans un pétrin et autoclavé 20 min. à 121°C (essai F4C4).

Dans les deux cas, on effectue une inoculation avec  $2.10^7$  spores.g<sup>-1</sup> MS et on règle la teneur en eau des milieux à environ 55%. Ils sont ensuite fermentés sur 10 cm de hauteur de couche dans des cuves aérées. Au cours de ces cultures, le milieu est strié par intermittence à l'aide d'une spatule pour réduire sa température. Pendant la fermentation, l'atmosphère est renouvelée en permanence par un air conditionné dont la température, l'humidité et le débit sont tels qu'indiqués dans les Tableaux.

Les résultats sont présentés dans les Tableaux 2 (essai F4C3) et 3 (essai F4C4).

Ces données permettent de dégager plusieurs conclusions :

- L'humidification du son de blé, préalablement au traitement thermique est nécessaire à une production de glucoamylases efficace. Au-delà de la décontamination, le traitement thermique du son de blé favorise vraisemblablement la gélatinisation de l'amidon ;

- Le pH apparaît comme un bon indicateur qualitatif de l'évolution de la croissance et de la production de GA fongiques, sans pour autant permettre d'estimer la quantité de GA obtenue :

- Une légère agitation du milieu (striage) n'altère pas la production d'enzymes ;

- L'évolution de la teneur en eau pendant ces deux fermentations indique un assèchement considérable du milieu de culture qui pourrait être préjudiciable à la croissance fongique.

**EXEMPLE 3** : Production de glucoamylases en fermenteur pilote fourni par la Société FUJIWARA : importance du maintien de l'humidité du milieu au cours de la fermentation.

Cet essai a été mis en œuvre avec un fermenteur pilote vendu par la Société FUJIWARA, Okayama, Japon, et du son de blé BCE. Il diffère notamment du fermenteur utilisé dans l'exemple 2 par le diamètre de la cuve qui est de 0,66 m contre 0,35 m pour les cuves INRA. Dans ce fermenteur, 20 kg de milieu à 55% d'eau préparés selon le mode son

humide décrit dans l'exemple 2 sont nécessaires pour mettre en œuvre une culture sur 12 cm d'épaisseur. L'agitation est assurée par trois vis sans fin verticales à rotation constante qui viennent mixer le milieu dans la cuve en rotation (5-10 min/tour). Au cours de la fermentation, comme pour les  
5 cuves INRA de l'exemple 2, l'atmosphère gazeuse est renouvelée en permanence par un air conditionné dont la température, l'humidité et le débit sont tels qu'indiqués dans le Tableau 4.

Au cours de cet essai appelé FII, l'opportunité d'une régulation de l'humidité a été étudiée. Des mesures ponctuelles de l'humidité de la  
10 culture, effectuées avec un appareil à infrarouge, et de la masse de milieu sont utilisées pour déterminer la quantité d'eau à ajouter pour maintenir la teneur en eau du milieu au-dessus de 50%.

Les résultats de cet essai FII sont reportés dans le Tableau 4. Les résultats obtenus appellent les commentaires suivants :

15 - FII indique clairement que le maintien de la teneur en eau entre 50 et 55% favorise la production d'enzymes avec 1600 UG/g MS libérées après 44 h de fermentation, soit plus du double de l'activité obtenue au cours de l'essai F4C2 de l'exemple 2 qui n'avait pas bénéficié de cette régulation ;

- la stabilisation de la production d'enzymes dès 44 h de culture  
20 corrélée à l'apparition de spores fongiques montre qu'il n'est pas nécessaire de poursuivre la culture au-delà de cette phase ;

- une régulation satisfaisante de la température du milieu autour de 35°C peut être obtenue par une bonne combinaison du conditionnement de l'air et de l'agitation du milieu ;

25 - la culture supporte sans dommages le brassage intermittent mis en œuvre par le système d'agitation du fermenteur FUJIWARA.

EXEMPLE 4 : Production de glucoamylases en fermenteur pilote INRA agité de 50 l : utilité d'un prétraitement thermique du son à la vapeur et d'une culture en "conditions stériles".

30 Ce fermenteur pilote est semblable à celui présenté dans WO-A-94 18306 et sur la figure 4 de l'article de A. DURAND et Collaborateurs précité. Cet outil permet de traiter le son à la vapeur directement dans le



fermenteur, mode de préparation préféré à l'échelle industrielle. La culture est également préparée, inoculée et réalisée en conditions stériles à l'exception des prélèvements, ce qui confère une semi-stérilité à cet essai et diffère des deux précédents exemples.

5 A) Conditions expérimentales

9 kg de son BCE sont introduits dans le fermenteur, pré-humidifiés par 1,5 l d'eau, puis stérilisés en place 20 minutes à 121°C, avec une agitation périodique de 5 secondes toutes les 5 minutes. Ce traitement permet d'atteindre un taux d'humidité de 46%, ajusté ensuite à 55% lors de l'inoculation.

Le son est inoculé par une préparation de type koji :

180 g de son BCE (55% d'humidité initiale) fermentés 4 jours à 35°C sont mélangés à 3 litres d'eau stérilisée de façon à obtenir une suspension de spores qui constitue l'inoculum.

15 Les conditions initiales de la fermentation sont les suivantes :

18,3 kg de culture à 55% d'humidité et un pH initial de 5,7 ;

40 cm de hauteur de couche ;

Débit d'aération : 314 l.min<sup>-1</sup> ;

T<sub>air d'entrée</sub> : 35°C ;

20 Humidité relative de l'air à l'entrée : 95%.

B) Suivi de la fermentation

Outre la mesure du pH, de la température du milieu, du pourcentage de matière sèche et de la production de GA, l'évolution de la masse de la culture est enregistrée en continu sur le fermenteur de 50 l agité, tandis que, pour le réacteur non stérile, des pesées de la culture sont effectuées à 21 h et à 42 h de fermentation.

Ces mesures de la masse présentent un double intérêt :

Maintien de l'humidité au cours de la culture par estimation du pourcentage de MS.

30 Pendant la fermentation deux phénomènes contribuent à la diminution de la masse de la culture, il s'agit :

- de l'assèchement du milieu d'une part que l'on désire compenser par un apport d'eau,

- de la perte de matière sèche d'autre part, liée à la croissance du champignon.

5 Cette perte de matière sèche n'est pas négligeable, 20% de MS étant perdus en 40 h de culture, soit 0,5% de MS par heure si l'on fait l'approximation d'une perte linéaire.

A partir de là, connaissant à chaque instant la masse de la culture ( $M(t)$ ), il est possible d'en déduire le pourcentage de MS théorique au temps

10 t, par la relation :

$$\% \text{ MS théorique (t)} = \frac{\text{MSI (MSI. 0,5\%)} \cdot t}{M(t)} \quad \text{où MSI est la quantité de matière}$$

15 sèche initiale.

Lorsque ce % MS ainsi calculé dépasse 50%, une addition d'eau stérilisée est effectuée de façon à ramener ce pourcentage à 45%.

#### Expressions des résultats par gramme de MS initiale.

20 Les évolutions de la masse et celles du pourcentage de MS mesuré permettent de calculer la perte de matière sèche réelle ( $P_{MS}$  exprimée en %) au cours de la culture. Ainsi, la quantité de GA exprimée jusque là en  $\text{UG.g}^{-1}$  MS peut être exprimée en  $\text{UG.g}^{-1}$  MS initiale grâce à la relation suivante :

$$(\text{UG.g}^{-1} \text{ MSI}) = (\text{UG.g}^{-1} \text{ MS}) \cdot (100 - P_{MS})/100$$

#### 25 C) Résultats

Les Tableaux 5 et 6 récapitulent les conditions opératoires et les résultats obtenus en réacteur agité sur son vapeur.

30 Malgré l'aération de la culture par un air saturé en humidité, l'assèchement du milieu est tel qu'il a été nécessaire à deux reprises de réajuster sa teneur en eau quand elle descendait en dessous de 50% comme indiqué sur le Tableau 5.

La température du milieu a pu être maintenue à une valeur moyenne de 35°C grâce à l'abaissement de l'air d'entrée, mais surtout par une agitation intermittente.

Dans ces conditions de culture, la croissance du champignon, dont on  
5 suit l'évolution par la mesure du pH, est maintenue pendant 60 h et permet d'atteindre une production de 1436 UG.g<sup>-1</sup> MS en 44 h et de 1990 UG.g<sup>-1</sup> MS en 63 h. Ramenée à la MS initiale, la quantité de GA produite est respectivement de 1160 et 1540 UG.g<sup>-1</sup> MSI. Pour comparaison, nous  
avons obtenu dans le cadre de l'exemple 3 en 44 h de culture 1605 UG.g<sup>-1</sup>  
10 MS équivalentes à 1067 UG.g<sup>-1</sup> MSI. Cette information est intéressante car elle indique que la productivité de ces deux essais est identique, mais que les conditions expérimentales de l'exemple 4 ont permis de prolonger la production d'enzymes même avec 40 cm de hauteur de couche.

Le traitement du son à la vapeur puis sa fermentation dans le  
15 réacteur INRA de 50l agité prolonge donc la culture fongique et la production d'enzymes.

Ramenée à la MS initiale, la quantité de GA produite est de 1540 UG.g<sup>-1</sup> MSI.

Sur les mêmes échantillons, des dosages d'activités xylanases et  
20 protéases ont été effectués. Les résultats obtenus sont très satisfaisants avec un maximum, en moyenne, à 50 h de fermentation de

350 UX.g<sup>-1</sup> MSI pour les xylanases ;

400 UP.g<sup>-1</sup> MSI pour les protéases.

Grâce à l'enregistrement en continu de la masse, il a été possible de  
25 calculer la perte de matière sèche au cours de la culture. Elle est d'environ 23% au bout de 60 h de culture (à 2% près compte tenu de la précision des pesées).

EXEMPLE 5 : Utilisation des sons fermentés produits dans l'Exemple 4 pour l'hydrolyse de farines de blé

30 Une série de saccharifications avec les sons fermentés obtenus dans l'exemple 4 a été menée sur des farines de blé préalablement soumises à un traitement de liquéfaction enzymatique classique. La préparation de

glucoamylases AMG 300L® commercialisée par la Société NOVO a servi de témoin. Ces essais ont été réalisés avec une farine de blé conventionnelle type 45. Les conditions opératoires sont récapitulées dans le Tableau 7 pour 750 g de moult.

5

TABLEAU 7

Produit	AMG 300L®(Novo)	Son fermenté	Son fermenté séché
Référence	AMG 300 L	Ex. 4	Ex. 4
Présentation	Liquide	Son humide	Son sec
Mode conservation	à +5°C	à -20°C	à T ambiante
Farine	Commerciale type 45	Commerciale type 45	Commerciale type 45
Quantité utilisée (g)	300	300	300
Mat. Sèche du milieu (%)	35	35	35
Cond. Liquéfaction	1h/88°C/pH 6,1	1h/88°C/pH 6,2	1h/88°C pH 6,2
Enzyme	125µl Termamyl. 120L®	125µl Termamyl. 120L®	125µl Termamyl. 120L®
Cond. Saccharif.	44h/58°C/pH 4,6	40h/58°C/pH 4,55	44h/60°C/pH 4,52
Qt. Equiv. à 3500 UG	205 µl	4,3g	2,1g

Au cours de ces hydrolyses de farine de blé, nous avons prélevé trois échantillons de milieu à chaque fois. Les résultats de concentrations en sucres réducteurs (S.R.) à différents moments de la saccharification présentés dans le Tableau 8 sont la moyenne de ces trois prélèvements. Ces dosages, effectués selon la technique au DNS, ont été réalisés sur les surnageants des prélèvements centrifugés. On a également mesuré la viscosité finale des produits saccharifiés.

10

19  
TABLEAU 8

Mesures	AMG 300L® (Novo)	Son fermenté	Son fermenté séché
Conc. S.R. ((initiale (g/l)	180,9±4,6	185,0±3,1	171,5±4,5
Conc. S.R. finale (g/l)	327,5±18,5	325,0±22,5	348,3±19,1
Viscosité (mPa.s)	6,80	2,82	2,80

Par ailleurs, on a constaté un accroissement de la teneur en azote soluble des moûts après saccharification dû à l'action protéolytique du son fermenté.

Ces résultats indiquent que les sons fermentés produits dans l'Exemple 4 sont capables d'hydrolyser la farine de blé avec la même efficacité qu'une préparation standard de GA, quel que soit leur mode de stockage.

L'hydrolyse de la farine avec du son fermenté entraîne également une réduction notable de la viscosité comparée à une préparation enzymatique conventionnelle.

#### Exemple 6

Cet exemple illustre la possibilité de produire une quantité considérable de xylanases et peu de glucoamylases avec la souche d'*Aspergillus niger*.

Cet essai a été mis en oeuvre dans le fermenteur pilote Fujiwara avec du son BCE et une souche d'*A. niger* Ref. ATCC 201202 connue pour sa capacité à produire des xylanases. Le fonctionnement du fermenteur pilote est détaillé dans l'Exemple 3. 20 kg de milieu à 55 % d'humidité, préparés comme dans l'exemple 2, sont mis en oeuvre dans cet exemple. Comme dans l'exemple 3, durant la fermentation, l'humidité du milieu a été maintenue supérieure à 50 % et la température du milieu régulée autour de 35°C.

Au final, la souche A. niger ATCC 201202 a produit, après 37 heures dans ces conditions de fermentation, un son fermenté ayant 727 UX/g MS et 162 UG/g MS.

Exemple 7 : Intérêt de l'incorporation de son fermenté selon l'invention dans un aliment avicole à base de blé destiné à des poulets de chair.

Il est connu que les hémicellulases des farines de blé sont partiellement solubles dans l'eau et augmentent la viscosité du contenu intestinal, réduisant ainsi la libération et l'absorption de nutriments.

Il a été démontré que l'ajout d'hémicellulases engendre une dégradation des hémicelluloses, permettant ainsi de réduire la viscosité du contenu intestinal et d'améliorer la performance zootechnique d'animaux monogastriques tels que des poulets de chair, nourris avec des aliments dont la céréale unique est le blé.

Une expérimentation a été menée sur 1 200 poulets de chair Ross pour montrer l'intérêt de l'utilisation du son fermenté porteur d'activité hémicellulase (xylanase), en comparaison d'un aliment sans enzyme et d'un aliment contenant une source de xylanase standard, le produit Avizyme. Des aliments avec ou sans enzyme ont été préparés de façon à nourrir 4 lots de 300 poussins. Leur composition est détaillée dans le Tableau 9. Les aliments de croissance (AL CR) ont été utilisés pour les 21 premiers jours d'élevage puis ont été remplacés par des aliments de finition (AL FI) pendant 18 jours.

25

TABLEAU 9

Aliment	AL CR	AL FI
Humidité (%)	10,6	11,4
Protéines (%)	21,3	19,1
Mat. Grasses (%)	6,1	6,4

L'aliment 1 n'a reçu aucune enzyme. Les aliments 2 et 3 ont été additionnés de 3 et 5 kg, respectivement, de son fermenté par tonne d'aliment. L'aliment 4 a été additionné de 0,6 kg d'Avizyme ® par tonne d'aliment.

- 5 Les résultats de ce test au bout de 39 jours d'élevage sont résumés dans le Tableau 10.

TABLEAU 10

Aliment	1	2	3	4
Son fermenté selon l'invention (kg/tonne) <sup>a</sup>	-	3,0	5,0	-
AVIZYME Finfeed (kg/tonne) <sup>b</sup>	-	-	-	0,6
Activité xylanase (UX/kg Aliment)	-	1 700	2 840	1 620
Indice consommation 39 jours <sup>c</sup>	1,775	1,748	1,738	1,745
Réduction Indice Conso (% Alim. 1) <sup>d</sup>	-	1,52	2,08	1,69
Mortalité (%)	2,3	2,0	3,0	2,3

10

- a. ce son fermenté présentait une activité glucoamylasique de 1000 UG/g de matière sèche, une activité protéolytique de 125 UP/g de matière sèche et une activité xylanasique de 600 UX/g de matière sèche ;
- 15 b. l'Avizyme ® est fourni par la société Finfeed, Finlande;
- c. rapport poids d'aliment consommé/gain de poids ;
- d. c'est la réduction en % du poids d'aliment consommé par rapport au poids d'aliment 1 (sans enzyme) consommé.

L'incorporation de son fermenté à un aliment avicole (3 ou 5  
20 kg/tonne) a permis de réduire significativement l'indice de consommation. Dans les conditions de l'essai, l'utilisation d'une dose de son fermenté supérieure à 3 kg/tonne paraît sans intérêt pratique. Les améliorations observées sont comparables à celles obtenues avec le produit commercial de référence Avizyme (0,6 kg/tonne). L'utilisation du son fermenté présente,

toutefois, l'avantage d'être moins coûteux que l'utilisation du produit enzymatique du commerce.

Il va de soi que les modes de réalisation décrits ne sont que des exemples et l'on pourrait les modifier, notamment par substitution  
5 d'équivalents techniques, sans sortir pour cela du cadre de l'invention.



TABLEAU 5 - Paramètres physico-chimiques de la FMS en fermenteur de 50 l agité sur son vapeur

Tps Cult (h)	Air, Tentrée (°C)	Air, Débit (l/min)	Air, % HR	T milieu moyenne	pH moyen	Masse totale	Traitement
0	35,0	314,0	94,6		5,70	18,30	
13	36,1	312,7	92,6	38,8	4,72	18,00	
13 (après agit)		471,0		38,6	4,68		agitation
16	29,8	448,6	94,6	32,4	4,60	17,50	agitation
18	33,2	466,5	77,2	31,0	4,37	17,10	
20,33	32,6	466,5	93,7	34,3	4,20	16,80	
23,66				34,2	4,13	15,80	
26	29,8	467,5	94,6	32,9	4,17	15,10	
26	29,8	467,5	94,6	33,3	3,81	17,30	agitation + 2,5 l d'eau
36,75	29,0	467,5	94,6				agitation
36,75	27,0	467,5	94,6	29,9	3,71	14,30	
40,58	27,0	467,5	94,6	31,0	4,20	13,10	
40,66	27,0	467,5	94,6	31,7	3,60	15,10	agitation + 2,1 l d'eau
44,58		448,6		33,6	3,71	14,10	
47,17		467,5		34,8	4,04	13,30	
50	27,0	303,3	94,6	32,0	4,09	12,80	agitation
63,33	28,7	303,0		31,0	5,75	10,30	

TABLEAU 6 : Synthèse des résultats de la FMS en fermenteur de 50 l agité sur son traité à la vapeur

Tps Cult (h)	Teneur en eau (%)	Perte de MS (%)	Perte en MS % (lissée)	UG/g MS moyenne	UG/g MSI moyenne	UX/g MS	UX/g MSI	UP/g MS	UP/g MSI
0	54,50	-2,07		0,00	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0
13	57,52	7,78	0,4	92,69	85,48	16,1	16,0	131,0	130,49
16	53,72	2,11	1,0	170,53	166,92	19,2	19,0	196,2	194,15
18	55,23	7,21	1,8	129,25	222,01	27,9	27,4	103,9	102,02
20,33	51,90	1,91	3,1	429,36	421,18	35,0	33,9	193,7	187,63
23,66	50,88	5,57	5,9	551,93	521,21	51,0	48,0	283,4	266,81
26	49,06	6,15	8,2	651,45	611,36	75,4	69,2	296,5	272,14
26	57,76	10,57	8,2	548,42	490,44	54,1	49,7	262,1	240,57
36,75	49,27	10,75	18,4	1127,09	1005,88	203,,5	166,2	359,1	293,20
40,58	51,14	20,55	20,5						
40,66	58,72	22,54	22,0	1278,58	990,35	227,3	180,7	347,9	276,52
44,58	54,10	19,21	22,6	1436,16	1160,27	408,3	318,6	367,1	286,45
47,17	54,01	23,07	23,2	1535,69	1181,43	511,5	395,7	496,8	384,30
50	54,66	26,67	24,4	1742,78	1277,91	429,8	330,1	628,2	482,48
63,33	44,69	22,62	22,6	1989,07	1539,07	410,3	310,1	478,3	361,5

TABLEAU 2

	Tps Cult (h)	Air, T entrée (°C)	Air, Débit (l/min)	Air, Débit (m/s)	Air, % HR	T milieu moyenne	pH moyen	% Humidité	UGA/g MS moyenne	Tps Cult. (h)
F4C3	0,0	35	174,4	8,0	96	25,0				0,0
	3,0	35	174,4	8,0	95	33,8	6,33			3,0
son sec	11,0	32	174,4	8,0	94	34,6	5,13	54,53	20,56	11,0
	14,0	30	174,4	8,0	95	35,4	4,38	54,19	71,13	14,0
Striage (17h)	16,0	30	174,4	8,0	94	33,3	4,36	52,17	123,12	16,0
	18,0	28	174,4	8,0	92	37,4	4,51	51,31	85,78	18,0
Striage (18h)	20,0	28	174,4	8,0	96	31,8	3,79	49,54	132,81	20,0
	22,0	28	174,4	8,0	95	34,7	4,12	45,17	188,0	22,0
	25,0	28	174,4	8,0		37,6	4,34	45,13	181,03	25,0
	28,0	28	174,4	8,0	94	32,6	4,63	36,47	129,58	28,0
	31,0	28	174,4	8,0		32,8	5,05	30,68	198,10	31,0
	40,0	28	174,4	8,0	95	31,9	5,69	23,96	246,86	40,0

**TABLEAU 3**

	Tps Cult (h)	Air, T entrée (°C)	Air, Débit (l/min)	Air, Débit (m/s)	Air, % HR	T milieu moyenne	pH moyen	% Humidité	UGA/g MS moyenne	Tps Cult. (h)
F4C4	0,0	35	174,4	8,0	96	25,0	5,96			0,0
	3,0	35	174,4	8,0	95	33,8	6,12			3,0
Striage (14h)	11,0	32	174,4	8,0	94	35,1	5,06	53,93	135,77	11,0
	14,0	30	174,4	8,0	95	39,9	4,66	53,04	121,02	14,0
	16,0	30	174,4	8,0	94	33,1	4,59	51,53	182,96	16,0
Striage (18h)	18,0	28	174,4	8,0	92	38,0	4,48	50,80	327,41	18,0
	20,0	28	174,4	8,0	96	34,3	3,72	51,76	360,25	20,0
	22,0	28	174,4	8,0	95	36,9	3,70	47,65	618,00	22,0
	25,0	28	174,4	8,0		36,3	4,15	41,68	658,05	25,0
son humide	28,0	28	174,4	8,0	94	30,9	4,53	35,73	660,03	28,0
	31,0	28	174,4	8,0		30,8	5,18	33,98	583,62	31,0
	40,0	28	174,4	8,0	95	30,2	4,88	30,02	702,74	40,0

TABLEAU 4

Tps (h)	Vitesse de ventilation tours/mn	Humidité air (%)	T°C entrée air	T°C milieu	Humidité milieu %	pH	UG/g MS	UG/g MSI	Tps (h)
0	15	99,0	35,0	25,0	54,0	6,36	4,3	4,3	0
10	15	98,5	35,0	34,7	53,7	5,95	23,9		10
12			33,0						12
15	15	98,6	33,0	34,5	51,6	4,92	133,3		15
18	15	98,8	33,0	37,3	49,7	4,18	304,8	273,1	18
21	15	98,3	30,0	30,7	54,7	3,83	472,1		21
24	15	98,2	30,0	31,9	52,4	3,76	709,2		24
28	15	97,9	30,0	33,4	46,6	4,08	1198,0		28
29	25	98,0	30,0		51,6		1054,0		29
38	15	98,6	32,0	31,5	39,2	5,00	1469,7	976,1	38
39	15	99,0	32,0		60,6		1338,0		39
42	15	99,2	32,0	33,9	59,7	5,28	1514,8		42
44	15	98,1	32,0	34,1	54,8	5,76	1605,1	1067,6	44
46	15	96,8	32,0	33,7	52,6	6,33	1601,0		46
66	15	99,0	32,0	32,4	34,0	7,28	1594,4	1161,7	66

Agit.

Agit.  
+ 3 l eauAgit.  
+ 2 l eauAgit.  
+ 6 l eau

REVENDEICATIONS

1. Un produit multienzymatique présentant des activités glucoamylasique, protéolytique et xylanasique, caractérisé en ce qu'il est constitué de son de blé fermenté avec une souche d'*Aspergillus niger*,  
5 lesdites activités enzymatiques glucoamylasique, protéolytique et xylanasique étant présentes aux valeurs minimales suivantes :  
- glucoamylasique : au moins 100 UG par gramme de matière sèche  
- protéolytique : au moins 100 UP par gramme de matière sèche  
- xylanasique : au moins 100 UX par gramme de matière sèche,  
10 avec la condition que l'activité glucoamylasique soit d'au moins 750 UG par gramme de matière sèche et/ou l'activité xylanasique soit d'au moins 300 UX par gramme de matière sèche.
2. Produit selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il présente une activité glucoamylasique d'au moins 750 UG/g de matière sèche.
- 15 3. Produit selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il présente une activité glucoamylasique d'au moins 1500 UG/g de matière sèche.
4. Produit selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il présente une activité xylanasique d'au moins 300 UX par gramme de matière sèche.
5. Produit selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il présente  
20 une activité xylanasique d'au moins 400 UX par gramme de matière sèche.
6. Produit selon la revendication 1, caractérisé en ce que la souche d'*Aspergillus niger* est choisie parmi la souche NRRL 3112, la souche ATCC 76061 et les souches obtenues à partir desdites souches par sélection ou mutation.
- 25 7. Produit selon la revendication 6, caractérisé en ce que la souche d'*Aspergillus niger* est la souche ATCC 76061.
8. Un procédé de production du produit multienzymatique défini à la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à  
(a) prendre du son de blé ; (b) à humidifier et traiter thermiquement ledit  
30 son de façon à le pasteuriser ou le stériliser ; (c) à inoculer le son de blé résultant par une souche d'*Aspergillus niger* ; (d) le son étant sous la forme d'une couche d'au moins 10 cm d'épaisseur, le faire fermenter à l'état solide

dans un réacteur aéré et agité périodiquement pendant une période de 1 à 3 jours, à une température de 28-38°C, ledit son étant réglé à une teneur en humidité initiale de 50 à 60% en poids sensiblement maintenue pendant la durée de la fermentation, dans des conditions d'aération propres à éviter  
5 une accumulation de dioxyde de carbone nuisible à la fermentation dans le réacteur et une élévation de la température due à la fermentation au-delà de la gamme indiquée, jusqu'à ce que le produit de fermentation présente les valeurs minimales suivantes d'activités enzymatiques :

- glucoamylasique : au moins 100 UG par gramme de matière sèche
  - 10 - protéolytique : au moins 100 UP par gramme de matière sèche
  - xylanasique : au moins 100 UX par gramme de matière sèche.
- avec la condition que l'activité glucoamylasique soit d'au moins 750 UG par gramme de matière sèche et/ou l'activité xylanasique soit d'au moins 300 UX par gramme de matière sèche.

15 9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que la souche d'*Aspergillus niger* est choisie parmi la souche NRRL 3112, la souche ATCC 76061 et les souches obtenues à partir desdites souches par sélection ou mutation.

20 10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que la souche d'*Aspergillus niger* est la souche ATCC 76061.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisé en ce qu'on évite que le taux d'humidité du son ne tombe en dessous de 45% au cours de la fermentation.

25 12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 11, caractérisé en ce qu'il comporte l'étape supplémentaire consistant à congeler ou à sécher le produit obtenu dans l'étape (d).

13. Utilisation d'un produit selon l'une quelconque des revendications 1-3 et 4-7 dans la production d'éthanol à partir du blé.

30 14. Utilisation d'un produit selon l'une quelconque des revendications 1 et 4-7, comme additif à un aliment pour animaux monogastriques.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. .nal Application No

PCT/FR 00/00163

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N1/14 C12N9/34 C12N9/62 C12N9/24 C12P7/06  
A23K1/165 //(C12N1/14,C12R1:685)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P A23K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>LABELLE P ET AL: "Comparative study of wheat flour saccharification and ethanol production with two glucoamylase preparations."</p> <p>INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS., vol. 6, no. 3-4, 1 August 1997 (1997-08-01), pages 291-295, XP002119202</p> <p>ELSEVIER., NL</p> <p>ISSN: 0926-6690</p> <p>the whole document</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-13



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 April 2000

Date of mailing of the international search report

04/05/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lejeune, R



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00163

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ABRAHAM T E ET AL: "Development of an alternate route for the hydrolysis of cassava flour."            STARCH STARKE.,            vol. 41, no. 12, 1989, pages 472-476,            XP002119203            WILEY-VCH VERLAG, WEINHEIM., DE            ISSN: 0038-9056            abstract            page 472, left-hand column</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1-12
X	<p>HAN M S ET AL: "Saccharification and ethanol fermentation from uncooked starch using Aspergillus niger koji."            KOREAN JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY,            vol. 17, no. 4, 1985, pages 258-264,            XP002119204            abstract</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1-12
X	<p>GOWTHAMAN, M. K. ET AL: "Gas concentration and temperature gradients in a packed bed solid-state fermentor."            BIOTECHNOL. ADV. (1993), 11(3), 611-20,            XP002119205            abstract            page 613, line 21 - line 23</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1-12
A	<p>DATABASE FSTA 'Online!            INTERNATIONAL FOOD INFORMATION SERVICE (IFIS), FRANKFURT/MAIN, DE            STACHOVICZ K J ET AL: "Preliminary selection of mould strains producing proteolytic enzymes in submerged cultures."            Database accession no. 74-3-08-10602            XP002119207            abstract            &amp; PRACE INSTYTUTOW I LABORATORIOW BADAWCZYCH PRZEMYSLU SPOZYWCZEGO,            vol. 23, no. 2, 1973, pages 311-320,            Inst. Przemyslu Fermentacyjnego, Warsaw, Poland</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1
L	<p>ATCC FILAMENTOUS FUNGI NINETEENTH EDITION, 1996, page 52 XP002119206            left-hand column, paragraph 4            (L: ATCC 76061 correspond à Aspergillus awamori)</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/00163

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N1/14 C12N9/34 C12N9/62 C12N9/24 C12P7/06  
A23K1/165 //(C12N1/14, C12R1:685)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C12P A23K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>LABELLE P ET AL: "Comparative study of wheat flour saccharification and ethanol production with two glucoamylase preparations." INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS., vol. 6, no. 3-4, 1 août 1997 (1997-08-01), pages 291-295, XP002119202 ELSEVIER., NL ISSN: 0926-6690 le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-13



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 avril 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04/05/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nt,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lejeune, R

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Doc. de Recherche Internationale No  
PCT/FR 00/00163

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités. avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	ABRAHAM T E ET AL: "Development of an alternate route for the hydrolysis of cassava flour." STARCH STARKE., vol. 41, no. 12, 1989, pages 472-476, XP002119203 WILEY-VCH VERLAG, WEINHEIM., DE ISSN: 0038-9056 abrégé page 472, colonne de gauche ---	1-12
X	HAN M S ET AL: "Saccharification and ethanol fermentation from uncooked starch using Aspergillus niger koji." KOREAN JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, vol. 17, no. 4, 1985, pages 258-264, XP002119204 abrégé ---	1-12
X	GOWTHAMAN, M. K. ET AL: "Gas concentration and temperature gradients in a packed bed solid-state fermentor." BIOTECHNOL. ADV. (1993), 11(3), 611-20, XP002119205 abrégé page 613, ligne 21 - ligne 23 ---	1-12
A	DATABASE FSTA 'Online! INTERNATIONAL FOOD INFORMATION SERVICE (IFIS), FRANFURT/MAIN, DE STACHOVICZ K J ET AL: "Preliminary selection of mould strains producing proteolytic enzymes in submerged cultures." Database accession no. 74-3-08-10602 XP002119207 abrégé & PRACE INSTYTUTOW I LABORATORIOW BADAWCZYCH PRZEMYSŁU SPOZYWCZEGO, vol. 23, no. 2, 1973, pages 311-320, Inst. Przemysłu Fermentacyjnego, Warsaw, Poland ---	1
L	ATCC FILAMENTOUS FUNGI NINETEENTH EDITION, 1996, page 52 XP002119206 colonne de gauche, alinéa 4 (L: ATCC 76061 correspond à Aspergillus awamori) -----	